

Pengaruh Metode Stratifikasi Suhu Rendah, Krioprotektan Dan Kriopreservasi Terhadap Viabilitas Benih Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Effects of Methods Low Temperature Stratification, Cryoprotectants and Cryopreservation on the Viability of Rosele Seeds (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Dede Suhendra, Haryati*, Luthfi A. M. Siregar

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155

*Corresponding author : atie.koto@yahoo.co.id

ABSTRACT

The objective of the research was to know effect of treatment low temperature, cryoprotectants, cryopreservation and it's combination to seed viability of rosele. The research was conducted at the Seed Technology Laboratory, Agriculture Faculty, University of Sumatera Utara, Medan with height ± 25 meters above sea level, in January to February 2014, using a randomized block design with 5 level low temperature stratification, cryoprotectants and cryopreservation treatment as well combination and control. Parameters observed were moisture content seed (%), germination rate (day), germination normal (%), abnormal sprouts (%), seeds die (%), vigor index (%), wet weight of sprouts (g), dry weight of sprouts (g). The results showed that rosele seed viability using liquid nitrogen significantly different than without giving liquid nitrogen, provision cryoprotectants and cooling rate -5°C temperature before it immersed in liquid nitrogen not were optimal.

Keywords: seed rosele, low temperature stratification, cryoprotectans, cryopreservation

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan suhu rendah, krioprotektan, kriopreservasi dan kombinasinya terhadap viabilitas benih rosela. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian ± 25 meter diatas permukaan laut, bulan Januari sampai Februari 2014, menggunakan rancangan acak kelompok dengan 5 taraf perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi serta kombinasinya dan kontrol. Parameter yang diamati adalah kadar air benih (%), laju perkecambahan (hari), kecambah normal (%), kecambah abnormal (%), benih mati (%), indeks vigor (%), bobot basah kecambah (g), bobot kering kecambah (g). Hasil penelitian menunjukkan viabilitas benih rosela menggunakan nitrogen cair berbeda nyata dengan perlakuan tanpa pemberian nitrogen cair dan pemberian krioprotektan serta laju pendinginan suhu -5°C sebelum direndam dalam nitrogen cair belum optimal.

Kata kunci: benih rosela, stratifikasi suhu rendah, krioprotektan, kriopreservasi

PENDAHULUAN

Saat ini rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) menjadi begitu populer karena hampir di setiap pameran tanaman obat, nama rosela selalu diperkenalkan. Rosela memiliki

kandungan senyawa kimia yang dapat memberikan banyak manfaat atau khasiat, antara lain mengobati gangguan berbagai penyakit dengan kandungan *gossiptin*

anthocyanin dan *gluciside hibiscin* yang terdapat di dalamnya. Salah satu upaya pengembangan rosela adalah dengan perbanyakan benih.

Saat ini permasalahan yang dialami pada perbanyakan benih adalah dalam hal penyimpanan. Koleksi plasma nutfah yang utama di dunia adalah berupa benih, karena menyimpan benih merupakan cara yang paling efisien untuk konservasi dalam jumlah besar. Dengan benih juga dapat memudahkan pendistribusian plasma nutfah. Kebutuhan dasar yang diperlukan dalam penyimpanan plasma nutfah ini adalah suhu serendah mungkin dan kadar air benih dalam keseimbangan dengan kelembaban relatif. Banyak benih yang perlu dikenai temperatur tertentu yakni temperatur rendah sebelum dapat diletakkan di temperatur yang cocok untuk perkecambahannya.

Cara yang sering dipakai dengan memberi temperatur rendah pada keadaan yang lembab disebut stratifikasi. Selama stratifikasi terjadi sejumlah perubahan dalam benih yang berakibat menghilangnya bahan-bahan penghambat pertumbuhan atau terjadi pembentukan bahan-bahan yang merangsang pertumbuhan. Dalam hal ini stratifikasi digunakan untuk melakukan tahap perlakuan perendaman benih pada suhu rendah dan dibekukan dengan nitrogen cair pada tahap kriopreservasi yang merupakan salah satu alternatif dalam hal penyimpanan benih yang baik.

Kriopreservasi merupakan teknik yang potensial untuk penyimpanan plasma nutfah jangka panjang dan juga teknik penyimpanan untuk jangka waktu yang lama. Dalam teknik ini sel-sel dan meristem ataupun bagian lain dari tanaman dibekukan dan disimpan pada kondisi yang terkontrol dalam nitrogen cair pada suhu -196°C . Pada suhu nitrogen cair, sel-sel mempunyai sedikit atau bahkan sama sekali tidak mempunyai aktivitas metabolisme dengan viabilitas sel yang tetap terpelihara, sehingga bahan tanaman dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama.

Faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi bergantung pada teknik yang diterapkan yakni pada teknik pembekuan

cepat. Untuk teknik pratumbuh, keberhasilan ditentukan oleh jenis dan komposisi krioprotektan dalam media tumbuh. Untuk teknik vitrifikasi, enkapsulasi-vitrifikasi dan droplet freezing, keberhasilan ditentukan oleh jenis, konsentrasi dan lama perendaman dalam krioprotektan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan suhu rendah, krioprotektan, kriopreservasi dan kombinasinya terhadap viabilitas benih rosela.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian ± 25 meter diatas permukaan laut, mulai bulan Januari sampai Februari 2014.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih rosela sebagai bahan pengamatan perkecambahan, nitrogen cair, PVS2 (DMSO, gliserol, etilen glikol dan sukrosa) sebagai krioprotektan, pasir, aquades dan air. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung nitrogen, lemari pembeku (freezer), bak kecambah, meteran, botol-botol plastik, gayung aluminium, timbangan analitik, beaker glass, batang pengaduk, oven, handsprayer, gunting, karung goni, label, ember, pisau, termometer, kalkulator, kamera dan alat tulis.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok dengan 5 taraf perlakuan yakni kontrol, PVS2 sebagai krioprotektan direndam selama 2 jam, suhu -5°C disimpan selama 1 jam, nitrogen cair direndam selama 24 jam dan kombinasi antara perlakuan tersebut dengan 3 ulangan. Data yang berpengaruh nyata setelah dianalisis, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5 %.

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan mempersiapkan benih dengan cara dipanen biji yang sudah matang fisiologis selanjutnya dilakukan penyimpanan benih dengan cara dikering anginkan terlebih dahulu lalu dimasukkan ke dalam desikator untuk menurunkan kadar airnya lalu dilakukan pengukuran kadar air benih awal

sebelum aplikasi, setelah itu dilakukan aplikasi perlakuan, membuat larutan krioprotektan PVS2 dengan cara mencampurkan 30 ml gliserol + 15 ml DMSO + 15 ml etilen glikol dalam media dasar sukrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 0,4 M yang mempunyai massa relatifnya 342 didapat berat sukrosanya 5,47 g untuk dilarutkan dengan aquades sebanyak 40 ml, lalu didapat larutan (PVS2) sebagai krioprotektan sebanyak 100 ml dan benih direndam selama 2 jam, lalu dilakukan laju pendinginan dengan cara benih dimasukkan ke dalam freezer pada suhu $-5^{\circ}C$ selama 1 jam dan dilakukan perendaman dengan nitrogen cair dengan cara dimasukkan benih ke dalam tabung nitrogen dengan menggunakan gayung alumunium dan benih sebelumnya dimasukkan ke dalam botol kecil dari plastik dengan lama perendaman 24 jam sesuai urutan perlakuannya yakni:

(P0) sebagai kontrol, (P1) benih direndam di dalam larutan krioprotektan selama 2 jam lalu direndam di dalam nitrogen cair selama 24 jam, (P2) benih disimpan pada suhu $-5^{\circ}C$ selama 1 jam lalu direndam di dalam nitrogen cair selama 24 jam, (P3) benih direndam di dalam larutan

krioprotektan selama 2 jam lalu disimpan pada suhu $-5^{\circ}C$ selama 1 jam dan direndam di dalam nitrogen cair selama 24 jam dan (P4) benih direndam di dalam nitrogen cair selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan imbibisi untuk memicu perkecambahan benih dan dilakukan pengecambahan di bak perkecambahan dan setelah itu dilakukan pemeliharaan selama pengamatan berlangsung.

Parameter yang diamati adalah kadar air benih (%), laju perkecambahan (hari), kecambah normal (%), kecambah abnormal (%), benih mati (%), indeks vigor (%), bobot basah kecambah (g), bobot kering kecambah (g).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan diketahui bahwa perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan kadar air benih (%), kecambah normal (%), kecambah abnormal (%), indeks vigor (%), bobot basah (g) dan bobot kering (g). Tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan laju perkecambahan (hari) dan benih mati (%).

Kadar Air Benih (%)

Tabel 1. Kadar air benih pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Kadar air (%)
P0 (Kontrol)	10,71 b
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	14,28 a
P2 ($-5^{\circ}C$ 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	11,53 b
P3 (Krioprotektan 2 jam + $-5^{\circ}C$ 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	14,17 a
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	11,05 b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5 %.

Kadar air benih yang tertinggi terdapat pada perlakuan perendaman dengan krioprotektan selama 2 jam dan direndam dengan nitrogen cair selama 24 jam (P1) yaitu 14,28 % dan kadar air terendah terdapat pada perlakuan kontrol (P0) 10,71 (Tabel 1).

Perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi lainnya yang tidak menggunakan krioprotektan tidak

menunjukkan kenaikan kadar air benih yang terlalu tinggi, sedangkan pada perlakuan yang menggunakan krioprotektan dapat menaikkan kadar air benih secara signifikan. Dalam hal ini krioprotektan merupakan senyawa kimia berbentuk cair yang cepat masuk ke dalam benih sehingga meningkatkan kadar air benih yang berfungsi sebagai pelindung, yang digunakan untuk teknik kriopreservasi yang

mana penggunaan krioprotektan bertujuan untuk melindungi benih pada suhu dibawah titik beku. Pada proses kerjanya krioprotektan dengan cepat masuk ke dalam sel dan melindungi sel tersebut. Fitriyatmi (1996) menyatakan bahwa penggunaan krioprotektan pada penyimpanan dengan suhu rendah

ditunjukkan untuk mengurangi kerusakan akibat terbentuknya kristal - kristal es. Krioprotektan yang digunakan memiliki sifat-sifat mencegah air, menjadi pelarut bagi elektrolit dan memiliki sifat dapat masuk ke dalam sel dengan cepat.

Laju Perkecambahan (hari)

Tabel 2. Laju perkecambahan pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Laju perkecambahan (hari)
P0 (Kontrol)	2,03
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	2,15
P2 (-5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	2,27
P3 (Krioprotektan 2 jam + -5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	2,15
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	2,14

Laju perkecambahan tercepat terdapat pada perlakuan kontrol (P0) sebesar 2,03 hari dan laju perkecambahan terlama terdapat pada perlakuan penyimpanan pada suhu -5°C

selama 1 jam dan di rendam dalam nitrogen cair selama 24 jam (P2) sebesar 2,27 hari (Tabel 2).

Kecambah Normal dan Abnormal (%)

Tabel 3. Kecambah normal dan abnormal pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Kecambah normal (%)	Kecambah abnormal (%)
P0 (Kontrol)	95,33 a	1,33 c
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	79,33 b	19,33 b
P2 (-5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	58,67 c	40,67 a
P3 (Krioprotektan 2 jam + -5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	58,67 c	36,67 a
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	71,33 b	28,67 ab

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5 %.

Kecambah normal tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol (P0) yaitu 95,33 % dan kecambah normal terendah terdapat pada perlakuan penyimpanan pada suhu -5°C selama 1 jam dan direndam dalam nitrogen cair selama 24 jam (P2) dan perlakuan perendaman dengan krioprotektan selama 2 jam kemudian disimpan pada suhu -5°C selama 1 jam dan direndam dalam nitrogen

cair selama 24 jam (P3) sebesar 58,67 %, lalu kecambah abnormal yang tertinggi terdapat pada penyimpanan pada suhu -5°C selama 1 jam lalu direndam dengan nitrogen cair selama 24 jam (P2) yaitu 40,67 % dan kecambah abnormal terendah terdapat pada perlakuan kontrol (P0) sebesar 1,33 % (Tabel 3).

Kecambah normal pada perlakuan menggunakan nitrogen cair tertinggi terdapat pada perlakuan perendaman krioprotektan selama 2 jam dan direndam dengan nitrogen cair selama 24 jam (P1) yaitu 79,33 %. Pada perlakuan menggunakan nitrogen cair tertinggi adalah hanya menggunakan krioprotektan dan penggunaan laju pendinginan kurang optimal sebagai faktor yang mempengaruhi keberhasilan dari kriopreservasi. Rataan terendah terdapat pada perlakuan yang menggunakan laju pendinginan sehingga penggunaan krioprotektan dengan laju pendinginan juga menunjukkan hasil kecambah normal yang rendah. Kondisi laju pendinginan yang kurang optimum bisa merusak sel yang akan dilakukan pada tahapan perlakuan sebelum menggunakan nitrogen cair.

Khoirinaya (2011) menyatakan laju pendinginan yang lambat menyebabkan tingginya peluang terbentuknya kristal es yang bersifat letal bagi sel. Terbentuknya kristal es intraselular dapat menyebabkan kerusakan membran, organel sel dan hilangnya kemampuan embrio untuk tumbuh setelah proses pembekuan. Keberhasilannya tidak terlepas dari pengoptimalan masing-masing tahapan yang digunakan dalam hubungannya dengan ukuran, permeabilitas, dan sifat fisiologi awal sel tersebut sehingga dapat mempertahankan sel.

Selanjutnya pada perlakuan menggunakan nitrogen cair membuat kecambah abnormal menjadi tinggi karena dipengaruhi oleh perlakuan dari krioprotektan dan laju pendinginan yang kurang optimum sehingga dampak dari suhu nitrogen cair berpengaruh terhadap benih sehingga

pertumbuhannya sebagian menjadi abnormal. Persentase kecambah abnormal tertinggi terdapat pada perlakuan dengan menggunakan laju pendinginan, yang mana laju pendinginan penggunaannya kurang optimal pada perlakuan dengan menggunakan nitrogen cair akibatnya terjadi kerusakan pada fisik benih sehingga pertumbuhan kecambah abnormal tinggi. Kerusakan kecambah pada perlakuan lainnya terjadi pada perlakuan P1, P3 dan P4. Penggunaan krioprotektan dan laju pendinginan yang kurang optimum menyebabkan kerusakan pada benih semakin tinggi.

Roostika dan Mariska (2003) menyatakan bahwa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kriopreservasi adalah kecepatan pembekuan, jenis dan konsentrasi krioprotektan, suhu akhir pembekuan dan tipe dan keadaan fisiologis bahan yang akan disimpan.

Jika pembekuan terlalu lambat maka sel terlalu terdehidrasi sehingga konsentrasi zat elektrolit dalam sel menjadi tinggi. Jika pembekuan terlalu cepat maka sel kurang mengalami dehidrasi sehingga terjadi formasi es intraselular yang bersifat letal. Penambahan krioprotektan dalam memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir ke luar dan terjadi dehidrasi.

Lalu Fitriyatmi (1996) menyatakan bahwa konsentrasi krioprotektan pada masing-masing benih berbeda-beda. Penggunaan konsentrasi krioprotektan yang tepat dapat melindungi benih dan menghasilkan daya berkecambah benih yang lebih baik.

Benih Mati (%)

Tabel 4. Benih mati pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Benih mati (%)
P0 (Kontrol)	3,33
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	1,33
P2 (-5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	0,67
P3 (Krioprotektan 2 jam + -5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	4,67
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	0,00

Benih mati tertinggi terdapat pada perlakuan perendaman dengan krioprotektan selama 2 jam kemudian disimpan pada suhu -5°C selama 1 jam dan direndam dalam Indeks Vigor (%)

nitrogen cair selama 24 jam (P3) sebesar 4,67 % dan benih mati terendah terdapat pada perlakuan direndam dalam nitrogen cair selama 24 jam (P4) sebesar 0,00 % (Tabel 4).

Tabel 5. Indeks vigor pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Indeks vigor (%)
P0 (Kontrol)	22,62 a
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	18,45 b
P2 (-5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	13,59 c
P3 (Krioprotektan 2 jam + -5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	12,74 c
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	16,74 b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5 %.

Indeks vigor tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol (P0) sebesar 22,62 % dan indeks vigor terendah terdapat pada perlakuan perendaman dengan krioprotektan selama

2 jam kemudian disimpan pada suhu -5°C selama 1 jam dan direndam dalam nitrogen cair selama 24 jam (P3) sebesar 12,74 % (Tabel 5).

Bobot Basah dan Bobot Kering Kecambah (g)

Tabel 6. Bobot basah dan bobot kering kecambah pada perlakuan stratifikasi suhu rendah, krioprotektan dan kriopreservasi

Perlakuan	Bobot basah kecambah (g)	Bobot kering kecambah (g)
P0 (Kontrol)	37,89 a	3,37 a
P1 (Krioprotektan 2 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	31,05 b	2,93 b
P2 (-5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	23,95 c	2,03 d
P3 (Krioprotektan 2 jam + -5°C 1 jam + Nitrogen Cair 24 jam)	20,51 d	1,96 d
P4 (Nitrogen Cair 24 jam)	28,45 b	2,51 c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5 %.

Bobot basah dan kering kecambah tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol (P0) sebesar 37,89 g dan 3,37 g sedangkan bobot basah dan kering terendah terdapat pada perlakuan perendaman dengan krioprotektan selama 2 jam kemudian disimpan pada suhu -5°C selama 1 jam dan direndam dalam nitrogen cair selama 24 jam (P3) sebesar 20,51 g dan 1,96 g (Tabel 6).

Secara keseluruhan berdasarkan pengamatan yang dilakukan menunjukkan kecambah normal tertinggi terdapat pada tanpa perlakuan (kontrol) dibandingkan dengan perlakuan menggunakan nitrogen cair

begitu juga dengan parameter indeks vigor, bobot basah kecambah dan bobot kering kecambah. Parameter tersebut tidak terlepas peranannya dari hasil kecambah normal.

SIMPULAN

Viabilitas benih rosela pada perlakuan nitrogen cair terbaik terdapat pada perlakuan (P1) yaitu direndam dengan larutan krioprotektan selama 2 jam dan direndam dengan nitrogen cair selama 24 jam yakni sebesar 79,33 %. Viabilitas benih rosela pada perlakuan tanpa nitrogen cair lebih baik dari

pada perlakuan dengan nitrogen cair. Viabilitas benih rosela menggunakan nitrogen cair untuk penyimpanan plasma nutfah belum optimal dengan pemberian krioprotektan (PVS2) selama 2 jam dan laju pendinginan pada suhu -5°C selama 1 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdual-baki, A.A., dan J.D. Anderson, 1973. *Relationship Between Decarboxilation of Glutamic Acid and Vigour In Soybean Seed*, Crop Sci., 13, 222–226.
- Amri, I. 2011. Karakteristik Pemanfaatan Nitrogen Cair Sebagai Pengganti Chemical Cleaning Untuk Pembersihan Tangki Industri. Dalam Prosiding SNTK TOPI. Pekanbaru 21-22 Juli 2011. Hal : 20-21.
- Fitriyatmi, I. 1996. Pengaruh Suhu Rendah Terhadap Viabilitas Benih Jagung (*Zea mays* L.) Kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) Rambutan (*Nephelium lappaceum*) dan Matoa (*Pometia pinnata*) Setelah Pembekuan Dalam Nitrogen Cair. Skripsi. Program Studi Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal : 2-15.
- Hasanah, M. 2002. Peran Mutu Fisiologik Benih dan Pengembangan Industri Benih Tanaman Industri. Jurnal Litbang Pertanian, 21(3) : 84 – 91.
- Justice, O. L., dan L. N. Bass. 1994. Prinsip dan Praktek Penyimpanan Benih. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Khoirinaya, C. 2011. Viabilitas Embrio Mencit (*Mus musculus albinus*) Setelah Kriopreservasi Dengan Vitrifikasi Ganda Pada Tahap Perkembangan Zigot dan Dilanjutkan Pada Tahap Blastosis. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal : 6-7.
- Mungnisjah W.Q., A. Setiawan, Suwanto, dan C. Santiwa. 1994. Panduan Praktikum dan Penelitian Bidang Ilmu dan Teknologi Benih. Grafindo Persada. Jakarta.
- Pancaningtyas, S. 2013. Perkembangan Teknologi Kriopreservasi Pada Tanaman Serta Peluang Penerapannya Pada Kakao (*Theobroma cacao* L.). J. Review Penelitian Kopi dan Kakao.1(1):12-23.
- Roostika, I. T., I. Mariska dan. 2003. Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi Dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman. Bul. Plasma Nutfah. 9(2).
- Sa'diyah, H. 2009. Pengaruh Invigorasi Menggunakan Polietilena Glikol (PFG) 6000 Terhadap Viabilitas Benih Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.). Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. Hal : 17.